

L28 ANSWER 2 OF 20 HCAPLUS COPYRIGHT 2004 ACS on STN  
 AN 1997:48722 HCAPLUS  
 DN 126:72331  
 ED Entered STN: 23 Jan 1997  
 TI Chemiluminescent substrate for enzyme immunoassay  
 IN Sakaki, Hidejiro; Mitani, Motohiro; Koinuma, Yasuyoshi; Totani, Yoshiaki  
 PA Nippon Oils & Fats Co Ltd, Japan  
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.  
 CODEN: JKXXAF  
 DT Patent  
 LA Japanese  
 IC ICM C12Q001-34  
 ICS G01N021-78; G01N033-543  
 CC 9-10 (Biochemical Methods)  
 FAN.CMT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 08294397	A2	19961112	JP 1995-125617	19950427 <--
PRAI	JP 1995-125617		19950427 <--		

CLASS

PATENT NO.	CLASS	PATENT FAMILY CLASSIFICATION CODES
JP 08294397	ICM	C12Q001-34
	ICS	G01N021-78; G01N033-543

OS MARPAT 126:72331

AB Chemiluminescent substrate for sugar-hydrolyzing enzyme is prepared for EIA. 3-(.beta.-D-galactopyranosyloxy)-6-(4-methoxyphenyl)-2-methylimidazole[1,2-a]pyrazine was prepared from 6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-3-(tetra-O-acetyl-.beta.-D-galactopyranosyloxy)imidazole[1,2-a]pyrazine, and used for chemiluminescent EIA.

ST chemiluminescence EIA substrate carbohydrate hydrolyzing enzyme  
 IT Immunoglobulins

RL: ARG (Analytical reagent use); ANST (Analytical study); USES (Uses)  
 (G, galactosidase; chemiluminescent substrate for EIA using carbohydrate-hydrolyzing enzyme)

IT Immunoassay  
 Immunoassay

(chemiluminescence enzyme; chemiluminescent substrate for EIA using carbohydrate-hydrolyzing enzyme)

IT 9001-02-9, Carbohydrate-hydrolyzing enzymes 9031-11-2, .beta.-Galactosidase

RL: ARU (Analytical role, unclassified); ANST (Analytical study)  
 (chemiluminescent substrate for EIA using carbohydrate-hydrolyzing enzyme)

IT 159503-66-9P

RL: ARU (Analytical role, unclassified); SPN (Synthetic preparation); ANST (Analytical study); PREP (Preparation)  
 (chemiluminescent substrate for EIA using carbohydrate-hydrolyzing enzyme)

IT 3068-32-4, 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-.alpha.-D-galactopyranosyl bromide 185311-71-1

RL: RCT (Reactant); RACT (Reactant or reagent)  
 (chemiluminescent substrate for EIA using carbohydrate-hydrolyzing enzyme)

IT 177205-13-9P

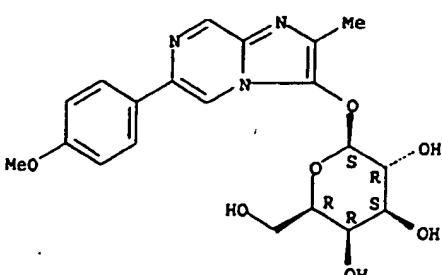
RL: RCT (Reactant); SPN (Synthetic preparation); PREP (Preparation); RACT (Reactant or reagent)  
 (chemiluminescent substrate for EIA using carbohydrate-hydrolyzing enzyme)

Gitomer 10/053482

Page 14

enzyme)  
 IT 159503-66-9P  
 RL: ARU (Analytical role, unclassified); SPN (Synthetic preparation); ANST (Analytical study); PREP (Preparation)  
 (chemiluminescent substrate for EIA using carbohydrate-hydrolyzing enzyme)  
 RN 159503-66-9 HCAPLUS  
 CN .beta.-D-Galactopyranoside, 6-(4-methoxyphenyl)-2-methylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-yl (9CI) (CA INDEX NAME)

Absolute stereochemistry.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-294397

(43) 公開日 平成8年(1996)11月12日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/34		6807-4B	C 1 2 Q 1/34	
G 0 1 N 21/78			G 0 1 N 21/78	C
33/543	5 7 5		33/543	5 7 5

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-125617

(22) 出願日 平成7年(1995)4月27日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 榊 秀次郎

茨城県つくば市春日2-20-3

(72) 発明者 三谷 元宏

茨城県つくば市梅園2-24-5

(72) 発明者 鯉沼 康美

茨城県つくば市東新井32-16

(72) 発明者 戸谷 義明

愛知県刈谷市井ヶ町広沢1

(74) 代理人 弁理士 高木 六郎 (外1名)

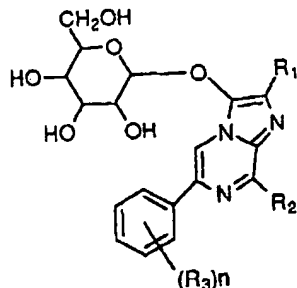
(54) 【発明の名称】 免疫学的活性物質の測定方法

(57) 【要約】

【目的】 糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質の化学発光方法及び定量法を提供する。

【構成】 糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質を、化学発光基質として一般式(1)

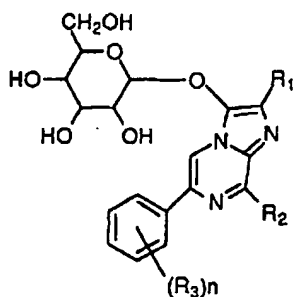
【化3】

(式中 R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1~20のアルキル基、炭素数6~20のアリール基、又は炭素数7~19のアリールアルキル基を示し、R<sub>3</sub> は炭素数1~5のアルキル基、アルコキシ基を示す。nは0~5の整数を示す)で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体と反応させることを特徴とする化学発光方法及び、この化学発光方法を用いることにより、試料中の測定対象物である免疫学的活性物質を定量することを特徴とする免疫学的活性物質の測定方法である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質を、化学発光基質として一般式(1)

【化1】



(式中R<sub>1</sub> およびR<sub>2</sub> はそれぞれ独立に、水素原子、炭素数1～20のアルキル基、炭素数6～20のアリール基、又は炭素数7～19のアリールアルキル基を示し、R<sub>3</sub> は炭素数1～5のアルキル基、又はアルコキシ基を示す。nは0～5の整数を示す)で表わされるウミホタルシフェリン誘導体と反応させることを特徴とする化学発光方法。

【請求項2】 糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質と、試料中の測定対象物である免疫学的活性物質との免疫複合体を、請求項1記載の化学発光方法を用いることにより、測定対象物を定量することを特徴とする免疫学的活性物質の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質、または、アビジン標識糖加水分解酵素、あるいはビオチン標識糖加水分解酵素の定量法に関する。本発明の免疫測定方法は各種診断薬に利用される。

【0002】

【従来の技術】最近、抗原抗体反応に基づくイムノアッセイの分野においてラジオイムノアッセイ(RIA)に代わる分析手段として化学発光酵素イムノアッセイ(CLEIA)が注目されている。CLEIAの用いられる代表的な酵素の一つとして、β-D-ガラクトシダーゼをあげることができる。このβ-D-ガラクトシダーゼを化学発光定量するための基質として、アダマンチルジオキセタン誘導体が報告されている(特開平2-180893)。しかしながら、アダマンチルジオキセタン誘導体は分子内に過酸化基構造を有するので光及び熱による分解、金属との反応によりレドックス分解を引き起こし易く、このために定量分析の誤差を招きやすい。また、試料中の測定対象物を測定時に発光させるために、測定液を強アルカリ条件(pHを10以上)にすることが必要であり、しかして、強アルカリではβ-D-ガラクトシダーゼが失活し、強アルカリの廃液が出る欠点がある。

【0003】一方、既存のウミホタルシフェリン誘導体は、1重項酸素、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシルラジカル等の活性酸素と選択的に反応し、発光することからこれら活性酸素の微量定量に有効であることが知られている。しかしながら酵素により発光させることはできない。また本発明のウミホタルシフェリン誘導体と類似の構造を有するイワシシフェリンが知られている(Inoue, S. らChem. Lett. 417-8(1987))。しかしながら、これは、グルクロニダーゼという特殊な酵素でのみ発光するに過ぎない。

【0004】そこで、一般の臨床検査試薬でも用いられている、β-D-ガラクトシダーゼ等の糖加水分解酵素標識抗体等を用いた、温和な中性領域での免疫学的活性物質の定量が強く望まれている。

【0005】

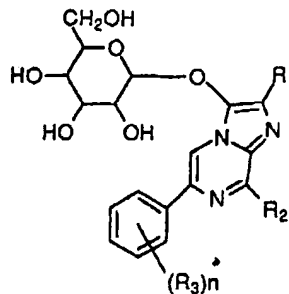
【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、高感度、高精度、簡便かつ温和な条件下で、糖加水分解酵素標識抗体、あるいは糖加水分解酵素標識抗原を用いた、免疫学的活性物質の測定方法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質を、化学発光基質として、一般式(1)

【0007】

【化2】



(式中R<sub>1</sub> およびR<sub>2</sub> はそれぞれ独立に、水素原子、炭素数1～20のアルキル基、炭素数6～20のアリール基、又は炭素数7～19のアリールアルキル基を示し、R<sub>3</sub> は炭素数1～5のアルキル基、又はアルコキシ基を示す。nは0～5の整数を示す)で表わされるウミホタルシフェリン誘導体と反応させることを特徴とする化学発光方法が提供される。

【0008】また、本発明によれば、糖加水分解酵素標

識免疫学的活性物質と、試料中の測定対象物である免疫学的活性物質との免疫複合体を、前記の化学発光方法を用いることにより、測定対象物を定量することを特徴とする免疫学的活性物質の測定方法が提供される。

【0009】以下、本発明を更に詳細に説明する。本発明において、免疫学的活性物質は抗体または抗原を意味する。本発明で用いる糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質における糖加水分解酵素としては、例えば、 $\alpha$ -D-グルコシダーゼ、 $\beta$ -D-グルコシダーゼ、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ等を挙げることができる。

【0010】糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質において、免疫学的活性物質である抗体は各種抗原に対する全ての抗体を使用することができる。また、糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質において、免疫学的活性物質である抗原は、各種抗体に対する全ての抗原を使用することができる。抗体は、例えば、各種ステロイドホルモンに対する抗体、各種腫瘍マーカーに対する抗体、各種感染症に対する抗体、各種ペプチドホルモンに対する抗体、その他各種抗体などである。

【0011】前記において、ステロイドホルモンとしては、例えば、 $T_4$ 、 $T_3$ 、 $T_3$  U、TSH、TGR、 $FT_4$ 、 $FT_3$ 、サイクログロブリン、コルチゾール、エストラジオール、エストリオール、プロゲステロン、テストステロン、17-OHP、エストロゲンなどが挙げられる。

【0012】腫瘍マーカーとしては、例えば、CEA、AFP、 $\beta$ 2-M、フェリチン、SCC、PAP、SPan、 $\gamma$ -SGM、CA19-9、CA125、CA50、NSE、PSA、TPAなどが挙げられる。

【0013】感染症としては、例えば、HAAb、HA(1gM)Ab、HBsAb、HBsAg、HBeAb、HBcAg、HBcAb、HBc(1gM)Ab、HDVAb、HIV、CMV、ATL、RSV、風疹、クラミジアAb、淋菌、梅毒、マイコプラズマなどが挙げられる。

【0014】ペプチドホルモンとしては、例えば、PTH、PRL、インスリン、グリカゴン、ガストリン、FSH、LH、HCG、PF $_4$ 、セクレチン、C-ペプチド、PST I、カルトシン、ソマトメジン、HGH、ACTH、ADHなどが挙げられる。

【0015】薬剤としては、例えば、フェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピン、バルプロ酸、アリミドン、エトサキシミド、トブラマイン、リドカイン、プロカインアミド、NAPA、ゲンタマイシン、カナマイシン、ジベカシン、ストレプトマイシン、ネチルマイシン、アミカシン、ジゴキシン、ジギトキシン、キシジン、テオフィリン、メソレキセート、アセトアミノフェノン、サリチル酸、シクロスポリンなどが挙げられる。

【0016】その他の抗体としては、例えば、IgE、アルゲニン特異 IgE、CK-MB、免疫複合体 (C3d-、C1q-)、ミオグロビン、IgG、IgA、IgM、C3、C4、抗サ

イクロブロリン抗体、抗マイクロソーム抗体、RF、ANA、便潜血、D-ダイマー、ヒスタミンなどが挙げられる。

【0017】本発明で用いる、ウミホタルルシフェリン誘導体は、前記一般式(1)で表わされる。式中R $_1$ およびR $_2$ の具体例として、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、トリデシル基、ヘキサデシル基、イコシル基等の直鎖状または分岐鎖状の炭素数1~20のアルキル基；フェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基、ナフタセニル基、ピレニル基、ペリレニル基等の炭素数6~20のアリール基；ベンジル基、フェネチル基、ジフェニルメチル基、トリチル基、トリル基、キシリル基、クメニル基、メシチル基等の炭素数7~19のアリールアルキル基を挙げることができる。R $_1$ とR $_2$ とは同一であっても、異なってもよい。式中R $_3$ の具体例として、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基等のアルキル基；メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、イソブトキシ基、t-ブトキシ基等のアルコキシ基を挙げることができる。但しこれらに限定されない。

【0018】化学発光させる際のpHは、一般にpH4~10の範囲であることが好ましく、更に、糖加水分解酵素の活性が維持されている範囲を選択することが好ましい。前記のpHの調整は、公知の緩衝溶液あるいは各種生理食塩水などで行うことが可能であり、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液などを挙げることができる。また、これらの溶液に Tween 20 (ICI 社商標)などの界面活性剤またはジメチルスルオキシド、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド、メタノール、あるいはエタノールなどの有機溶媒を0.01~50%添加してもよく、好ましくは、糖加水分解酵素の活性が低下しないような、0.05~20%添加してもよい。

【0019】前記化学発光反応を行う際の温度は一般に0~70℃の範囲であることが好ましく、特に糖加水分解酵素の活性が低下しないような15~60℃の範囲であることが好ましい。

【0020】糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質と、試料中の測定対象物である免疫学的活性物質との免疫複合体は、更に、該測定対象物と反応する各種抗体、各種抗原あるいは各種蛋白質など、または、該測定対象物と反応する各種固相化抗体、各種固相化抗原あるいは各種固相化蛋白質と結合していてもよい。固相は特に限定されないが、好ましくは、タイタープレート、ポリスチレンラテックス、ポリスチレンビーズ、ガラスビーズ、ガラスチューブ、ポリスチレンチューブ、磁気微粒子、

鉄微粒子などを挙げる事ができ、特に好ましくは、タイタープレート、ポリスチレンラテックス、磁気微粒子を挙げる事が出来る。

#### 【0021】

【発明の効果】本発明の化学発光方法および免疫測定方法は、高感度、高精度、簡便かつ温和な条件下で、糖加水分解酵素標識抗体、あるいは糖加水分解酵素標識抗原を用いて、試料中の測定対象物である免疫学的活性物質を定量することが出来る。

#### 【0022】

【実施例】以下本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0023】参考例：ウミホタルルシフェリン誘導体の合成

#### 参考例 1

6-(4-メトキシフェニル)-2-メチルイミダゾ(1,2-a)ピラジン-3-オン 0.1g (0.35mmol)と、リン酸二ナトリウム 1.1g (7.75mmol)の混合物中に、アセトニトリル5mlおよびベンゼン9mlを加えた後、モレキュラーシーブ4A 2.6gを加え室温で1時間攪拌した。続いて2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシルプロミド 0.18g (0.45mmol)とトリフルオロメタンスルホン酸銀 0.37g (1.43mmol)を加えて、窒素雰囲気下室温で2時間攪拌した。セライトを敷いたガラスフィルターにて反応溶液を濾過し、残渣をアセトニトリルおよびベンゼンにて洗浄した。濾液および洗浄液の溶媒を留去した後、塩化メチレン15ml及び飽和炭酸水素ナトリウム-食塩水10mlを加え、攪拌し、不溶物をガラスフィルターにて取り除いた。濾液の塩化メチレン層を分離した後、硫酸ナトリウムにて乾燥を行った。溶媒を留去後、得られた油状物をシリカゲルカラム(30%アセトニトリル/ベンゼン)および中圧カラムクロマトグラフィーにて精製すると、目的の6-(4-メトキシフェニル)-2-メチル-3-(テトラ-O-アセチル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシルオキシ)イミダゾ(1,2-a)ピラジンが収量0.08g (0.14mmol)、収率39%で得られた。

【0024】スペクトルデータを以下に示す。

MS(FAB): 586 (M+H)<sup>+</sup>, 256

Exact MS: 586.1995;

Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>11</sub>N<sub>3</sub>: 586.2037

#### 【0025】参考例2

6-(4-メトキシフェニル)-2-メチル-3-(テトラ-O-アセチル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシルオキシ)イミダゾ(1,2-a)ピラジン 0.05g (0.09mmol)にメタノール3.5mlと濃アンモニア水1.8mlを\*

\*加えた後、40℃で6時間30分攪拌した。白色沈澱を濾取し、メタノールから再結晶を行うと目的の3-( $\beta$ -D-ガラクトピラノシルオキシ)-6-(4-メトキシフェニル)-2-メチルイミダゾ(1,2-a)ピラジンが0.03g (0.07mmol)収率78%で得られた。

【0026】スペクトルデータを以下に示す。

MS(FAB): 418 (M+H)<sup>+</sup>

#### 【0027】実施例

タイタープレート (Maxisorp F16 Black; NUNC社) の16ウェルの各々に、100mMリン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解した5.0 $\mu$ g/mlのGoat Anti Mouse IgGを100 $\mu$ l加えて、4℃で12時間インキュベートした。インキュベート終了後、各16ウェルを、0.5% Tween 20、150mM NaCl を添加した10mMリン酸緩衝液 (pH7.5) で3回洗浄した。その後、5%ウシ血清アルブミン、0.5% Tween 20、150mM NaCl を添加した10mMリン酸緩衝液 (pH7.5) 溶液を各ウェルに300 $\mu$ l加えて、25℃で2時間インキュベートした。インキュベート終了後、各ウェルの溶液をデカンテーションにより除去した。その後、5%ウシ血清アルブミン、0.5% Tween 20、150mM NaCl を添加した10mMリン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解した、0fmol/ml、2fmol/ml、10fmol/ml、50fmol/ml、250fmol/ml、1250fmol/mlのMouse IgGの6種の各濃度を各ウェルに100 $\mu$ l加えて、25℃で30分間インキュベートした。インキュベート終了後、各ウェルを、0.5% Tween 20、150mM NaCl を添加した10mMリン酸緩衝液 (pH7.5) で3回洗浄した。その後、ウシ血清アルブミン、0.5% Tween 20、150mM NaCl を添加した10mMリン酸緩衝液 (pH7.5) で1000倍希釈した、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識 anti mouse IgG (AMERICAN QUALE社) を各16ウェルに100 $\mu$ l加えて、25℃で30分間インキュベートした。インキュベート終了後、各ウェルを、0.5% Tween 20、150mM NaCl を添加した10mMリン酸緩衝液 (pH7.5) で3回洗浄した。その後、参考例2にて得られた、100 $\mu$ M 3-( $\beta$ -D-ガラクトピラノシルオキシ)-6-(4-メトキシフェニル)-2-メチルイミダゾ(1,2-a)ピラジンのジメチルスルホキシド溶液1容及び1mM MgCl<sub>2</sub>を添加した、200mMリン酸緩衝液 (pH8.0) 9容を混合した溶液を、各ウェルに100 $\mu$ l添加して、35℃で10分間インキュベートした後、LUMINOUS CT-900D (ダイヤトロン社) にて各ウェルを10秒間測定して、発光カウントを数求めた。各濃度の測定カウント数、平均値、SD、CV値(%)は表1に示した。

#### 【0028】

#### 【表1】

表1 測定カウント数、平均値、SD、CV値(%)

Mouse IgG	0	2	10	50	250	1250
-----------	---	---	----	----	-----	------

7  
(fmol/ml)

8

	89	97	100	123	217	330
	96	90	97	124	212	313
	93	91	95	115	206	333
	85	85	88	122	218	314
	78	77	89	113	224	332
	80	79	82	125	212	360
	78	79	80	129	222	361
	68	75	79	108	284	391
	94	91	97	132	231	372
	92	88	88	110	214	362
	92	92	80	115	243	387
	83	86	90	111	224	346
	93	71	94	117	217	346
	76	80	91	119	224	371
	76	75	94	117	224	423
	76	80	86	121	241	370
平均値	84.3	83.5	89.4	118.8	225.8	356.9
S D	8.5	7.5	6.6	6.8	18.4	29.4
CV値(%)	10.1	9.0	7.4	5.8	8.2	8.3

表1より50 fmol/ml まで測定可能であることは明らかである。

## 【0029】比較例

実施例の100  $\mu$ M 3-( $\beta$ -D-ガラクトピラノシルオキシ)-6-(4-メトキシフェニル)-2-メチルイミダゾ(1, 2-a)ピラジンの代わりに、25 mM 2-

ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド水溶液を\*30 【表2】

\*用いて35℃で10分間インキュベート終了後、200 mMの炭酸ナトリウム溶液を各ウェルに100  $\mu$ l 添加した後、マイクロプレートリーダー (DINATEC 社) にて各ウェルの410 nmでの吸光度を求めた。各濃度の測定カウント数、平均値、SD、CV値(%) は表2に示した。

## 【0030】

表2 測定カウント数、平均値、SD、CV値(%)

Mouse IgG (fmol/ml)	0	2	10	50	250	1250
	0.044	0.042	0.085	0.095	0.274	0.48
	0.055	0.062	0.062	0.111	0.303	0.53
	0.068	0.074	0.064	0.093	0.303	0.584
	0.055	0.085	0.107	0.094	0.297	0.594
	0.056	0.065	0.053	0.095	0.297	0.616
	0.064	0.068	0.079	0.093	0.286	0.517
	0.03	0.064	0.059	0.125	0.247	0.558
	0.064	0.03	0.067	0.094	0.315	0.549
	0.047	0.056	0.062	0.099	0.271	0.461
	0.079	0.068	0.098	0.108	0.279	0.513
	0.064	0.083	0.068	0.096	0.32	0.522
	0.053	0.056	0.086	0.095	0.264	0.549
	0.068	0.04	0.074	0.12	0.31	0.484
	0.056	0.082	0.065	0.121	0.31	0.616
	0.062	0.064	0.101	0.094	0.269	0.539

9	(6)					特開平8-294397
	0.02	0.026	0.059	0.093	0.274	10 0.573
平均値	0.0553	0.0603	0.0743	0.1016	0.2887	0.5428
S D	0.0147	0.0180	0.0166	0.0114	0.0211	0.0466
CV値(%)	26.6	29.8	22.3	11.2	7.3	8.6

表2より250fmol/ml まで測定可能であることは明ら\* \*かである。